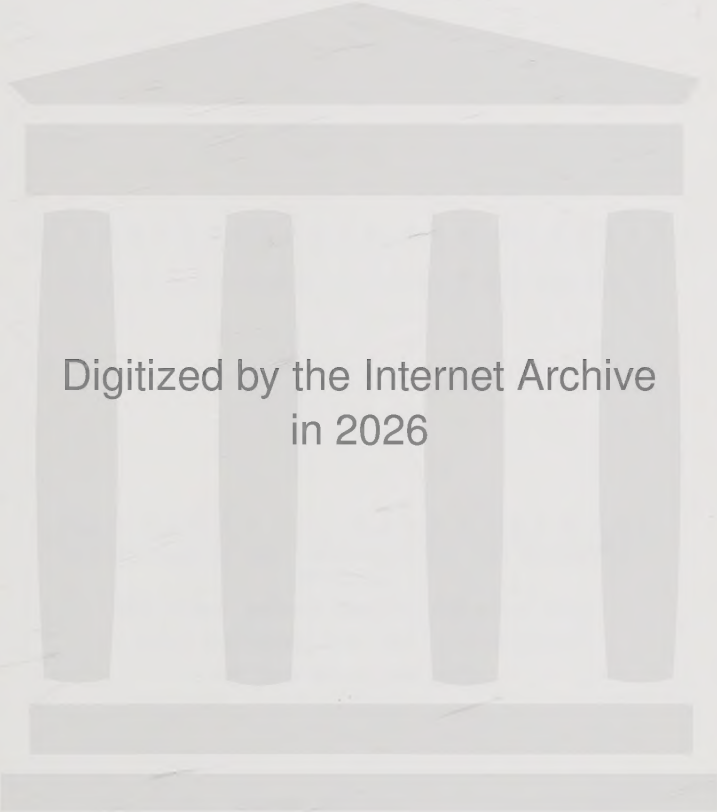


Hans-Helmut Kollath

UNTERSUCHUNGEN ZUR
HEPARINBESTIMMUNG BEIM MENSCHEN

Frankfurt am Main 1962



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551911_0080

Aus der I. Medizinischen Klinik der Johann Wolfgang -
Goethe - Universität zu Frankfurt am Main
(Direktor: Prof. Dr. med. F. HOFF)

U N T E R S U C H U N G E N Z U R H E P A R I N -
B E S T I M M U N G B E I M M E N S C H E N

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Medizin

der Hohen Medizinischen Fakultät der
Johann Wolfgang Goethe - Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

Hans-Helmut K o l l a t h
aus Wiesbaden

F r a n k f u r t a m M a i n 1962



Dekan:	Prof. Dr. med. K. Herzberg
Referent:	Prof. Dr. med. H. Fischer
Korreferent:	Prof. Dr.med. J. Frey
Mündliche Prüfung:	26.4.1962

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Professor Dr. med.
H. FISCHER für die Überlassung des Themas dieser
Arbeit sowie für seine Unterstützung während ihrer
Abfassung verpflichtet.

Auch Herrn Dr. med. K. BREDDIN gilt mein aufrichtiger
Dank für seinen wissenschaftlichen Rat und seine
stete Hilfsbereitschaft.

Inhaltsübersicht

<u>A. Allgemeiner Teil</u>	Seite
1. Was ist Heparin?	2
II. Bildungsstätten des Heparins.	3
III. Ausscheidung von Heparin.	5
IV. Der Co-Faktor des Heparins.	6
V. Heparin in freier und gebundener Form.	7
VI. Heparin im System der Blutgerinnung.	8
VII. Heparin und Schock, Komplement, Properdin	10
VIII. Therapeutische Wirkungen des Heparins.	12
IX. Schematische Zusammenstellung der in der Literatur angegebenen Werte des menschlichen Heparinblutspiegels. (Schema Nr. 2)	13a
X. Kritik an Schema Nr. 2.	14
<u>B. Experimenteller Teil.</u>	
I. Einführung.	17
II. Prüfung der von MONKHOUSE angegebenen Methode.	18
Methode.	
Tabelle Nr. 1 mit den Versuchsergebnissen.	
Graphische Darstellung der Versuchsergeb- nisse (Abb. Nr. 1).	
Ergebnisse und Diskussion.	
III. Der Thrombin - Test.	23
Versuchsbeschreibung.	
Modellversuch.	
a. Thrombin-Test-Eichkurve	
Tabelle Nr. 2	
b. Graphische Darstellung	
Abb. Nr. 2	
Ergebnis.	

IV. Eigene Methode zum Nachweis des im normalen Plasma des Menschen vorhandenen Heparins.	25
Problematik.	
Methode.	
a. Extraktion von Heparin aus Plasma.	
b. Gerinnungsphysiologische Auswertung im Thrombin-Test	
Versuch Nr. 1 - 24	
a. Tabelle Nr. 3 mit den Versuchsergebnissen	
b. Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse (Abb. Nr. 3)	
Ergebnisse und Diskussion.	
V. Metachromasie: Der "Tüpfel - Test".	32
Versuchsbeschreibung	
Abb. Nr. 4; 5; 6; 7; 8.	
Ergebnis	
VI. Versuche über die Ausbeute.	34
"Recovery-Versuch" in vitro mit Zusatz von Liqueminmengen bekannter Konzentration zu Plasma.	
Versuchsbeschreibung	
Tabelle Nr. 4	
"Recovery-Versuch" in vitro mit Liquemin-Lösungen bekannter Konzentration.	
Versuchsbeschreibung	
Tabelle Nr. 5	
"Recovery-Versuch" in vivo.	
Versuchsbeschreibung	
Tabelle Nr. 6	
Ergebnisse und Diskussion der "Recovery-Versuche".	
VII. Pyrexal - Versuche.	38
Problemstellung.	
Versuchsbeschreibung.	
Versuch Nr. 1 - 6.	
Tabelle Nr. 7	
Graphische Darstellung (Abb. Nr. 9)	
Ergebnisse und Diskussion.	

	Seite
VIII. Die Mastzellenleukämie.	42
Versuchsbeschreibung.	
Tabelle Nr. 8.	
Graphische Darstellung (Abb. Nr. 10).	
Ergebnisse und Diskussion.	
IX. Zusammenfassung.	45
X. Literatur - Verzeichnis.	
=====	

A. A l l g e m e i n e r T e i l.
=====

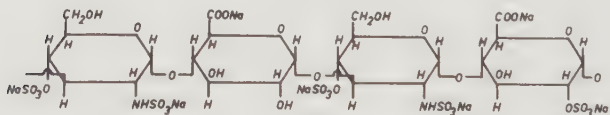
I. Was ist Heparin?

=====

HOWELL¹ und MAC LEAN² gelang es 1916 erstmals, aus Hundeleber einen Stoff zu isolieren, der sich als ein Inhibitor der Blutgerinnung erwies; sie bezeichneten ihn als H e p a r i n. HOWELL¹ beschreibt 1918 das Heparin als ein Phosphatid, welches sich als leicht wasserlöslich, als klare, nicht opaleszente Lösung von gelblicher oder, in stärke- r Konzentration, von rötlicher Farbe erwies. Es ist hitze- stabil (bis zu 120° C).

1935 gelang es JORPES³, die chemische Zusammensetzung des Heparins weitgehend zu klären. Danach handelt es sich um einen M u c o p o l y s a c c h a r i d p o l y s c h w e f e l s ä u r e e s t e r, der bei der chemischen Analyse G l u c u r o n s ä u r e, G l u c o s a m i n und S c h w e f e l s ä u r e liefert.

Das Molekulargewicht des Heparins schwankt zwischen 12 000 und 16 000. WOLFROM⁴ gibt folgende Konstitutionsformel an:



Bruttoformel: (C₂₄ H₃₁ O₃₅ N₂ S₅ Na₇)_x

II. Bildungsstätten des Heparins.

Über die Bildungsstätten des Heparins liegen heute folgende Angaben vor:

1877 wurden von EHRlich⁵ die nach ihm benannten Gewebsmastzellen entdeckt, die sich eingestreut in parenchymatösen Organen befinden. Besonders zahlreich finden sie sich in Leber, Lunge, Milz und der Adventitia der großen Gefäße.

LISON⁶ konnte 1935 zeigen, daß sich die Granula der Gewebsmastzellen mit Toluidinblau leuchtend rotviolett metachromatisch anfärben. Diese Metachromasie ist eine Reaktion, die für Schwefelsäureester mit hohem Molekulargewicht spezifisch ist (LISON⁶; WILANDER⁷).

Nachdem nun JORPES² die chemische Zusammensetzung des Heparins als ein Mucopolysaccharid-polyschwefelsäureester identifizierte, konnten JORPES, HOLMGREN und WILANDER⁸ 1937 nachweisen, daß es sich bei der metachromatischen Substanz in den EHRlich'schen Mastzellen um Heparin handelt.

ZOLLINGER⁹ wies dann mit dem Phasenkontrastmikroskop nach, daß das Heparin in den Granula der Gewebsmastzellen lokalisiert ist; nach ihm soll es sich beim Heparin um umgewandelte Mitochondrien handeln.

Daß auch die Blutbasophilen Heparinbildner sind, konnte durch die Untersuchungen von LAVIEs, BEHRENS und TAUBERT¹⁰ wahrscheinlich gemacht werden. Tatsächlich sind in der Literatur (MARTIN und ROKA¹¹, u.a.) einige Fälle von basophiler Leukämie bekannt, bei denen im Blut Substanzen von heparinoidem Charakter stark vermehrt nachgewiesen werden konnten.

Es entspricht der Definition innersekretorischer Drüsen, wenn man das Heparin der Mastzellen als Hormon auffaßt,

wie dies u.a. JUERGENS¹² und WILANDER⁷ annehmen.

Weiterhin ist experimentell bewiesen, daß parenteral zugeführtes Heparin in den Granula der Mastzellen gespeichert wird (SCHUERER¹³; FRICK¹⁴). Unter besonderen Umständen - z.B. im anaphylaktischen - und Peptonschock - geben diese Mastzellen wahrscheinlich Heparin ab (WILANDER⁷; u.a.).

III. Ausscheidung von Heparin.

=====

WILANDER⁷ stellte 1939 anhand von Tierexperimenten fest, daß ca. 20% des injizierten Heparins durch die Niere ausgeschieden werden; und zwar in der Hauptmenge innerhalb einer Stunde post injectionem.

MARBET und WINTERSTEIN¹⁵ teilten dann 1951 mit, daß im Organismus das injizierte Heparin Depolarisationsprozessen unterliegt und dabei einen Teil seiner Aktivität ($1/2$ bis $1/3$) verliert. In Form von Mucopolyschwefelsäureestern niederen Molekulargewichtes wird es zu ca. 50% mit dem Urin ausgeschieden. Nach einem Vorschlag von JAKUES wird dieses Ausscheidungsprodukt als U r o h e p a r i n bezeichnet.

Dieser Abbau des Heparins soll durch ein Fermentsystem (Heparinase) vor allem in der Leber erfolgen (KAUTZSCH¹⁶; SIMON¹⁷; La ROCHE¹⁸).

Ein anderer Teil des injizierten Heparins wird in den Mastzellen gespeichert (SIMON¹⁷; SCHUELLER¹³; FRICK¹⁴).

IV. Der Co-Faktor des Heparins.

=====

Soweit aus der erarbeiteten Literatur hervorgeht, bedarf Heparin zur Entfaltung seiner Wirkungen eines Co-Faktors im Blut-plasma. Über die Natur des Co-Faktors gehen die Meinungen allerdings auseinander: LOOMIS¹⁹; LYTTLETON²⁰; GOOSENS und Mitarbeiter²¹ fanden den Co-Faktor in der Globulinfraktion, während DYCKERHOFF und MARX²², QUICK²³, von KAULLA und MC DONALD²⁴, MARBET und WINTERSTEIN²⁵, sowie JUERGENS¹² glaubten nachweisen zu können, daß es sich um ein Albumin handelt.

Andere Forscher halten den Heparin-Co-Faktor und Antithrombin II für die gleiche Substanz (QUICK²⁶; BURSTEIN²⁷ und LOEB²⁸), was wiederum von ASTRUP⁶¹, SEEGER⁶² und LYTTLETON²⁹ bestritten wird.

Vermutlich verbindet sich das Heparin für seine jeweilige spezifische Wirkung mit verschiedenen Co-Faktoren. So geben HORN und BORSODI³⁰ an, daß sich das Heparin für seine Wirkung als Antithrombin mit einem Co-Faktor I von Albumincharakter verbindet, während es sich für seine Anti p r o-thrombinwirkung mit einem Co-Faktor liiert, dessen chemischer Charakter noch nicht geklärt sei.

V. Heparin in freier und gebundener Form.

=====

HORN und BORSODI³⁰ stellten 1948 folgende These auf:
Wenn sie zu einem System: Plasma + Thrombin + Toluidinblau
k e i n Heparin zfügten, so war die Gerinnungszeit gegenüber
einem System: Plasma + Thrombin infolge der Inaktivierung
des körpereigenen Heparins durch das Toluidinblau verkürzt.
Wenn sie nun zu dem System: Plasma + Thrombin + Toluidinblau
Heparin zugeben, so sei die Gerinnungszeit etwa gleich
der des einfachen Plasma - Thrombin - Systems gewesen. Dar-
aus zogen sie den Schluß, " daß ein Teil des Heparins in
adsorptiver oder enger chemischer Bindung, ein anderer Teil
lose gebunden in disponibler Form im Blut zirkuliert ".
MONKHOUSE³¹ (1950) vermutet, daß möglicherweise das natür-
lich im Blut des Menschen vorkommende Heparin in einer fest
gebundenen Form (an Eiweiß) vorliege.
In dieser Form entziehe es sich beim Menschen nach der
Ansicht des Autors einem experimentellen Nachweis.
Es ist festzuhalten, daß es sich hierbei um Hypothesen
handelt. Eine Entscheidung über die Richtigkeit dieser An-
nahmen kann nach dem bisherigen Stand des Wissens auf die-
sem Gebiet noch nicht gefällt werden.

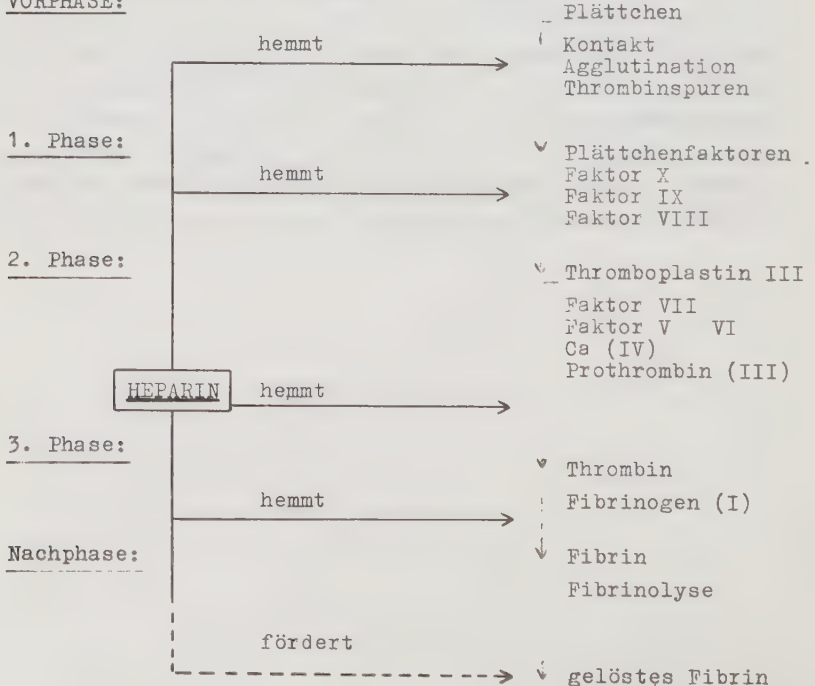
VI. Heparin im System der Blutgerinnung.

Heparin greift in alle Phasen der Blutgerinnung ein und wird daher auch als ein polyvalentes Antikoagulans bezeichnet. Für seine gerinnungshemmende Wirkung ist besonders die Schwefelsäure-Gruppe von Bedeutung. Ein plastisches Bild von dem Wirkungsmechanismus des Heparins auf die Blutgerinnung in den verschiedenen Phasen vermittelt das von MARBET und WINTERSTEIN³² aufgestellte folgende Schema:

Schema Nr. 1:

Wirkung des Heparins auf die Blutgerinnung³².

VORPHASE:



Erläuterung zu Schema Nr. 1

=====

Vorphase: Hier ist die Agglutination der Plättchen und damit die Freisetzung der Plättchenfaktoren gehemmt.

1. Phase: Durch Neutralisation von Plättchenfaktor III wird die Thromboplastinbildung verzögert.
2. Phase: Als Antithromboplastin hemmt es die Prothrombinumwandlung zu Thrombin; es wirkt also als Anti p r o-thrombin.
3. Phase: Als Antithrombin hemmt es die Bildung von Fibrin.

Nach HOWELL¹ ist die Anti p r o thrombinwirkung stärker als die Antithrombinwirkung.

Nach LOSNER³³ soll das Heparin auch direkt auf Fibrinogen wirken, indem es dessen Umwandlung zu Fibrin hemmt.

Weiterhin ist bekannt, daß Heparin auch die Struktur des Fibringerinnsels beeinflusst, wahrscheinlich, indem es die Vernetzung der Fibrinmoleküle hemmt.

Nachphase: Die fördernde Wirkung des Heparins auf die Fibrinolyse ist noch umstritten. Nach FONIO³⁴ wird durch Heparin die Retraktion des Fibringerinnsels gehemmt. Von anderer Seite wird mitgeteilt, daß das Heparin auch den Abbau des Fibrins beschleunigen soll (MARX und Mitarbeiter³⁵; von KAULLA und Mitarbeiter²⁴).

JUERGENS¹² nimmt an, daß die Förderung der Fibrinolyse lediglich auf der durch die Heparinwirkung bedingte Hemmung des Gerinnungsablaufes beruht. Dadurch entstehe ein besonders lockeres Substrat, das der besseren Angriffsmöglichkeit des körpereigenen fibrinolytischen Potentials unterliege.

VII. Heparin und Schock, Komplement, Properdin.

Die Rolle des Heparins beim Schock ist im Tierversuch ausreichend untersucht:

Schon SCHMIDT-MUELHEIM³⁶ stellte während des Pepton-Schockes beim Hund 1880 eine Koagulationshemmung fest.

HOWELL und Mitarbeiter¹ sowie FUCHS und Mitarbeiter³⁷ waren der Ansicht, daß es sich dabei um einen Heparineffekt handele.

WILANDER⁷ gelang es dann 1939 nachzuweisen, daß während des Pepton-Schockes beim Hund die Mastzellen - vor allem die der Gewebsmastzellen reichen Leber - ihre metachromatische Substanz verlieren; außerdem konnte er im Schockblut eine heparinaktive Substanz isolieren. Nach ihm erfolgt beim Pepton-Schock also eine Ausschwemmung von Heparin aus den Heparinocyten in das Blut.

Auch MONKHOUSE³¹ gelang es im Tierversuch, besonders beim Hund, während des Pepton- und anaphylaktischen Schockes mittels einer von ihm entwickelten Methode ("Phenolextraktion") eine Heparinämie nachzuweisen.

HORN und BORSODI³⁰ sehen in dieser Heparinämie während des Pepton- und anaphylaktischen Schockes einen Gegenregulationsmechanismus des Körpers gegen die Möglichkeit einer allgemeinen intravaskulären Gerinnung.

FISCHER und Mitarbeiter^{38,39} untersuchten das Verhalten der Blutgerinnung beim Hund nicht nur im Pepton-Schock, sondern lösten auch Schock mittels Protamin und Histon aus. Sie sind der Ansicht, daß es beim Pepton-Schock zu einem Verdrängungsmechanismus: Pepton $\rightarrow$ Heparin aus den Mastzellen kommt, wodurch es zur Heparinämie und damit zu der Gerinnungshemmung bzw. Verzögerung kommt. - Auch für Protamin und Histon gilt diese Verdrängung; jedoch vermögen Protamin und Histon Heparin zu inaktivieren. In diesen Fällen ist

für die Gerinnungsverzögerung eine Hemmung der Thrombokinase verantwortlich.

WILANDER⁷ konnte weiterhin die schon vor ihm durch von FALKENHAUSEN⁴⁰ und FUCHS³⁷ erzielten Versuchsergebnisse bestätigen, wonach es beim Hund während des Pepton-Schockes zu einer Abnahme des Komplementgehaltes im Blut aufgrund einer Inaktivierung durch Heparin kommt.

Das gleiche wurde später auch u.a. von FISCHER, FRITZSCH und ARGENTON bestätigt: sie fanden, daß im Schock nicht nur eine Abnahme des Gehaltes an Komplement, sondern auch eine solche von Properdin durch Heparin statthat^{41, 42}.

Alle diese Untersuchungsergebnisse sind im Tierversuch, insbesondere am Hund, nachgewiesen worden. Die Frage, ob diese Ergebnisse auch auf den Menschen übertragen werden können, steht bisher noch völlig offen.

Ein Grund dafür, daß man über die physiologische Bedeutung des Heparins beim Menschen bisher nur wenig weiß, liegt darin, daß es nicht zu verantworten ist, beim Menschen einen anaphylaktischen Schock experimentell auszulösen. Statt dessen kann man beim Menschen mit Hilfe hochgereinigter bakterieller Pyrogene (Lipopolysaccharid aus *Salmonella abortus equi*: Pyrexal") eine vegetative Gesamtumschaltung mit Fieberanstieg auslösen, die in ihrer Vorphase - vor dem Fieberanstieg - gewisse Ähnlichkeiten mit dem Pepton- und anaphylaktischen Schock hat.

Es steht deshalb u.a. zur Frage, ob in der Vorphase bzw. auf der Höhe des künstlich durch P y r e x a l ausgelösten Fiebers beim Menschen der gleiche Mechanismus wie beim Pepton- und anaphylaktischen Schock beim Tier mit seiner charakteristischen Heparinämie hervorgerufen werden kann. Über das Ergebnis wird unten berichtet werden (siehe experimentellen Teil).

VIII. Therapeutische Wirkungen des Heparins.

Therapeutisch wird Heparin schon seit 1935 verwendet und sein Anwendungsbereich hat sich seitdem ständig ausgeweitet:

- 1.) Zunächst bedient man sich der gerinnungshemmenden Wirkung des Heparins sowohl in vitro als auch in vivo.
 - a.) In vitro gelingt es, mit 100 I.E. Heparin 100 ml Blut für 7 - 8 Std. flüssig zu halten. Mit ca. 10 000 I.E. Heparin kann in vivo das Blut für ca. 7 Std. ungerinnbar gehalten werden. Es ist deshalb bei der Anwendung des extracorporalen Kreislaufes sehr geeignet.
 - b.) Weiterhin wird es bei der Prophylaxe und Therapie der Thrombose in Anwendung gebracht. Man verspricht sich davon erstens durch die Verzögerung der Blutgerinnung eine Verhinderung der Thrombenbildung, und zweitens aufgrund einer Begünstigung der körpereigenen Fibrinolyse durch das Heparin eine beschleunigte Auflösung schon entstandener Fibringerinnsel.
- 2.) Dem Heparin wird ein vasodilatatorischer Effekt zugeschrieben (MATIS⁴³; STORTI⁴⁴; u.a.). Dementsprechend findet Heparin bei einer Reihe von Durchblutungsstörungen Anwendung.
- 3.) Bekannt ist ferner der sogenannte "clearing effect" des Heparins. Mittels eines in vivo heparinisierten Plasmas gelingt es, ein lipämisches, trüb aussehendes Plasma zu klären. Man nimmt an, daß durch Heparin die hochmolekularen Lipide in niedermolekulare umgewandelt werden; gleichzeitig steigt der Gehalt an freien Fettsäuren (GROSSMAN und Mitarb.⁴⁵). Verantwortlich für diesen Kläreffekt ist der Polysaccharid-Charakter des Heparins; und in der Tat ist dieser Kläreffekt

keineswegs für Heparin spezifisch. Gelingt es doch auch mit anderen Substanzen von Polysaccharidcharakter, diesen Kläreffekt zu erzielen, wie z.B. mit Cellulose, Agar, Stärke, Dextran, Gummi arabicum, etc. (LEVY⁴⁶; u.A.).

- 4.) Eng damit im Zusammenhang steht die Arteriosklerosebehandlung mit Heparin: Ausgehend von der Annahme, daß der manifesten Arteriosklerose eine Hyperlipämie und vermehrte Bildung von Cholesterin vorausgeht, die sich sekundär in den Gefäßwänden ablagern, versucht man, durch Heparin eine Förderung des Lipoidabbaus und eine Senkung des Gesamtcholesterinspiegels im Blut zu erreichen. KELLER⁴⁷ hat erstmals bei Arteriosklerotikern eine Langzeitbehandlung mit Heparin durchgeführt. ENGELBERG und Mitarb.⁴⁸; u.a. berichten ebenfalls von guten Erfolgen bei der Behandlung mit Heparin bei arteriosklerotisch bedingter Hypertonie und Coronarsklerose.

Wenn damit auch nicht alle in vivo wie in vitro erzielten therapeutischen Wirkungen des Heparins vollständig aufgezählt sind, so zeigt dies doch die heute eminente Bedeutung des Heparins für die Therapie. Um so erstaunlicher ist, daß man bis heute noch nicht genau weiß, wie hoch der normale Heparinblutspiegel des Menschen ist, und ob Heparin überhaupt physiologischer Weise beim Menschen eine Rolle spielt.

Nachfolgend wird eine Zusammenstellung der bisher in der Literatur angegebenen Werte der Höhe des menschlichen Heparinblutspiegels und der Methoden, mit deren Hilfe sie ermittelt wurden, gegeben: siehe Schema Nr. 2

X. Kritik an Schema Nr. 2

HOWELL¹, der Entdecker des Heparins, vermutete 1918, daß das Heparin ein normaler Bestandteil des Blutes sei, und daß seine Funktion die Aufrechterhaltung der Flüssigkeit des Blutes gewährleiste. Es gelang ihm aber nicht, Heparin beim Menschen nachzuweisen.

Seitdem haben die verschiedensten Forscher versucht, den normalen Heparinblutspiegel des Menschen zu ermitteln. In Schema Nr. 2 werden sie angeführt, sowie die Nachweismethoden und die damit ermittelten Werte:

- 1.) Dazu ist zunächst zu sagen, daß die von den einzelnen Untersuchern angegebenen Werte ganz erheblich voneinander abweichen.
- 2.) Ein Teil der Autoren bedient sich einer metachromatischen Auswertung ihrer mit den verschiedenen Methoden erhaltenen Extrakte.

Unter Metachromasie versteht man die chromotrope Fähigkeit von Schwefelsäureestern mit hohem Molekulargewicht (nach der Formel $(R O S O_3 H)_x$ zusammengesetzt) und ihrer Salze in Gegenwart bestimmter Farbstoffe. So erfolgt z.B. ein Farbwechsel des Toluidinblaus in ein zartes violett, wenn es mit Schwefelsäureestern zusammengebracht wird.

Metachromasie ist also keineswegs spezifisch für Heparin allein, sondern auch anderen Stoffen, die im normalen Blut vorhanden sind, wie z.B. Chondroitin, ist dieser Effekt eigen. Für den Nachweis von heparinwirksamen Substanzen ist vielmehr mit Recht eine antikoagulierende Wirksamkeit zu fordern. Es ist bisher nur in einem Fall bei einem einzigen Patienten JAKES, MONKHOUSE und STEWARD⁵⁰ gelungen, aus Blut mittels der von ihnen ent-

wickelten "Oxylamin-Methode" einen Extrakt zu gewinnen, der im Thrombin-Test eine antikoagulierende Aktivität besaß.

- 3.) FREEMAN und Mitarb.^{54,55} sowie BASSIOUNI⁵³ bedienen sich bei der Auswertung der mittels "Oxylamin-" oder "Trypsin-Methode" erhaltenen Extrakte im Prinzip einer Elongation der Recalcifizierungszeit. Hierzu ist zu vermerken, daß die Recalcifizierungszeit durch eine Fülle von Komponenten verlängert werden kann (z.B. Temperatur, pH, Reinheitsgrad bzw. Oberflächenbeschaffenheit der verwendeten Reagenzien und Gefäße, etc.); für den Nachweis von Heparin ist sie keineswegs spezifisch genug. Zudem konnte ROSIVAL und Mitarb.⁵⁶ 1959 zeigen, daß die Veränderlichkeit der Recalcifizierungszeit beim Menschen in keiner Beziehung zum Heparin Gehalt steht, wie dies beim Hund der Fall sein soll.
- 4.) Die Protamintitration ist für kleine Heparinmengen, wie sie im normalen Blutspiegel zu erwarten sind, nicht empfindlich genug.
- 5.) Als am spezifischsten für den gerinnungsphysiologischen Nachweis für Heparin darf wohl der Thrombinneutralisierende Effekt des Heparins angesehen werden. MONKHOUSE und Mitarb.³¹ (1950) haben sich auch eines Thrombin-Testes bedient, allerdings ohne den Blutheparinspiegel beim Menschen ermitteln zu können.

Somit kommt man zu dem Ergebnis, daß die Höhe des normalen menschlichen Heparinblutspiegels bis heute noch nicht mit Sicherheit ermittelt werden konnte. Diese Ansicht wird auch von JAKUES⁵⁷, LEIKINA⁵⁸, JUERGENS¹², u.a. vertreten.

B. Experimenteller Teil
=====

I. Einführung.

=====

Wie bereits betont, ist die Frage nach der Höhe des menschlichen Heparinblutspiegels noch nicht geklärt.

Wir gingen bei unseren Experimenten von der Vermutung aus, daß der menschliche Heparinblutspiegel so niedrig ist, daß die bisher praktizierten Methoden nicht empfindlich genug sind, um diesen nachzuweisen. Es galt also eine Methode zu suchen, mit deren Hilfe sich sehr niedrige Heparinkonzentrationen, wie wir sie im menschlichen Blutplasma vermuteten, nachweisen lassen.

II. Prüfung der von MONKHOUSE angegebenen Methode.

Der von MONKHOUSE³¹ beschrittene Weg einer Phenolextraktion von Blutplasma, wodurch es gelingt, Eiweiß und Polysaccharide schonend zu trennen, erschien uns zunächst ein geeigneter Ausgangspunkt für unsere Experimente.

Zunächst galt es festzustellen, welches die kleinste Heparinmenge ist, die sich mit dieser Methode erfassen läßt: Aus diesem Grunde setzten wir Heparin (Liquemin - La Roche) in verschiedenen Mengen Normalplasma zu; das heparinisierte Plasma wurde dann den von MONKHOUSE³¹ angegebenen Versuchsbedingungen unterworfen (diese werden auf der nächsten Seite beschrieben) und der erhaltene Extrakt photometrisch ausgewertet.

Es wurden folgende Mengen von Liquemin zu Plasma zugesetzt:

1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 I.E. Liquemin pro 5 ml Plasma.

Um eine Leerwertkurve aufstellen zu können, wurden gesättigtem Phenolwasser Liquemin-aqua-dest.-Gemische gleicher Konzentrationen wie oben zugesetzt, und diese Lösungen - allerdings ohne Phenolextraktion - für die photometrische Auswertung den gleichen Bedingungen unterworfen, wie das heparinisierte Plasma.

Methode:

a.) Phenolextraktion.

5 ml Plasma werden mit 5 ml Phenol (wassergesättigt) und mit 1 ml eines Liquemin-aqua-dest.-Gemisches verschieden gewählter Konzentration versetzt.

Das Gemisch wird kräftig geschüttelt und dann bei Zimmertemperatur ca. 10 - 12 Std. stehen gelassen.

Dann bei 2750 U/min 20 min lang zentrifugieren.

Im Reagenzglas zeigt sich folgendes Bild:



- Phase I: wässrige Phase; enthält Polysaccharide und Wasser (phenolgesättigt).
 Phase II: enthält gefälltes Eiweiß und Phenol.
 Phase III: enthält Phenol (wassergesättigt).

Phase I wird abpipettiert.

Phase II und III werden mit 1 ml physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und anschließend 5 min lang scharf zentrifugiert (3000 U/min).

Diese "Wäsche" wird abpipettiert und zu Phase I hinzugegeben.

Diese um die angegebene "Wäsche" vermehrte Phase I wird mit 5 ml Äther gewaschen.

Die Ätherphase wird abpipettiert und der in Lösung verbliebene Äther im Wasserbad bei 65°C. (ca. 5 min lang) verdampft.

b.) Metachromasie (in eigener Modifikation).

Zu der Ätherfreien Phase I werden 3 ml eines Toluidinpuffers* zugegeben und kräftig geschüttelt.

Diese Lösung wird 1 Std. lang im Kühlraum bei 4°C. abgestellt. Dann 20 min scharf im Kühlraum zentrifugieren (bei 3000 U/min)

*Toluidinbleu-Puffer:	pH:	
Toluidinbleu:	0,050	g
Sekundäres Natriumphosphat:	0,1136	g
Citronensäure:	3,7645	g
Aqua dest.:	ad	100,0000 ml

Am Boden des Reagenzglases hat sich ein Niederschlag eines Toluidinblau-Heparin-Komplexes abgesetzt.

Die überstehende Flüssigkeit wird schnell deantiert und mit Hilfe von zugeschnittenen dünnen Filterpapierstreifen das Röhrchen von Farbstoff-Puffer sorgfältig befreit. Lediglich der am Boden haftende Heparin-Toluidinblau-Niederschlag wird belassen. Dieser Niederschlag wird anschließend in 4 ml einer Lösung aus NaOH und CH_3OH (im Verhältnis 1:10) gelöst.

Es folgt die photometrische Auswertung mittels Photometer Eppendorff mit Filter E 546:

Tabelle Nr. 1 a.

=====

Vergleichslösungen zur Aufstellung einer Leerwertkurve:

	Phenol- wasser ml	Toluidin blaupuffer ml	Liquemin-aqua- dest.-Gemische ml I. E.	Extinktion im Photo- meter E 546 x——x
1	5,0	3,0	1,0 = ----	0,000
2	5,0	3,0	1,0 = 1,0	0,247
3	5,0	3,0	1,0 = 2,0	0,692
4	5,0	3,0	1,0 = 3,0	0,853
5	5,0	3,0	1,0 = 4,0	0,971
6	5,0	3,0	1,0 = 5,0	1,107
7	5,0	3,0	1,0 = 10,0	1,351
8	5,0	3,0	1,0 = 15,0	1,465
9	5,0	3,0	1,0 = 20,0	1,739

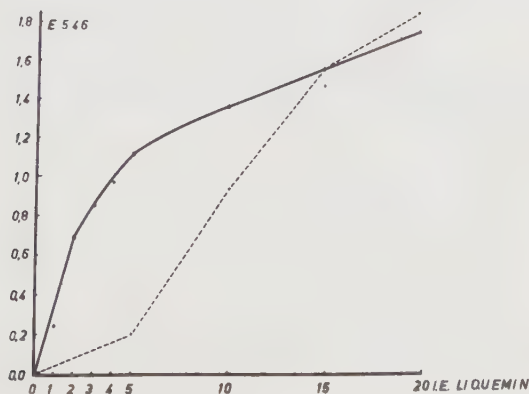
Tabelle Nr. 1 b.

Versuchsergebnisse:

	Plasma ml	Phenol ml	Liquemin-aqua- dest.-Gemisch ml I. n.	Toluidin- blaupurifiz ml	Extinction im Photometer E 546				
					Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Leer- wert- kurven- werte
1	5,0	5,0	1,0 = ----	3,0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2	5,0	5,0	1,0 = 1,0	3,0		0,013	0,131		0,247
3	5,0	5,0	1,0 = 2,0	3,0	0,001	0,017	0,144		0,692
4	5,0	5,0	1,0 = 3,0	3,0	0,074	0,123	0,025		0,853
5	5,0	5,0	1,0 = 4,0	3,0	0,108		0,176		0,971
6	5,0	5,0	1,0 = 5,0	3,0	0,198	0,052	0,334	0,199	1,107
7	5,0	5,0	1,0 = 10,0	3,0				0,950	1,351
8	5,0	5,0	1,0 = 15,0	3,0				1,350	1,465
9	5,0	5,0	1,0 = 20,0	3,0				1,844	1,739

Abb. Nr. 1.

=====



Ergebnisse und Diskussion:

Aus der Betrachtung der Tabelle Nr. 1 und der Abbildung Nr. 1 ergibt sich folgendes:

Es ist prinzipiell möglich, mit der von MONKHOUSE³¹ angegebenen Methode der "Phenolextraktion" Heparin nachzuweisen. Allerdings eignet sich die Methode nur für relativ sehr große Heparinmengen, die 15 - 20 I.E. betragen. Bei sehr viel niedrigeren Werten, mit denen man in menschlichem Plasma rechnen muß, ist die Methode dagegen zu unempfindlich und auch ungenau.

Deshalb mußten wir nach einer anderen Möglichkeit Ausschau halten die

1. für Heparin weitgehend spezifisch ist, und
2. mit deren Hilfe sich sehr kleine Mengen von Heparin nachweisen lassen.

III. Der Thrombin - Test.

=====

Da Heparin die Blutgerinnung hemmt, ist ein Nachweis von heparinaktiven Substanzen am genauesten mit gerinnungsphysiologischen Methoden zu führen. Der Thrombin-Test erwies sich uns als sehr geeignet.

Wir stellten Liquemin - aqua dest. - Gemische her, bei denen 0,1 ml Gemisch 0,01, 0,02, u.s.w. I.E. Liquemin enthielten und prüften die Verlängerung der Gerinnungszeit mit steigenden Dosen von Liquemin in einem Testplasma - Thrombin - System (bei 37°C.). Das Thrombin wird jeweils derart verdünnt, daß sich in den Proben ohne Heparinzusatz die Gerinnung nach 20 - 30 Sekunden vollzieht.

Im folgenden wird ein derart durchgeführter Modellversuch wiedergegeben:

Tabelle Nr. 2.

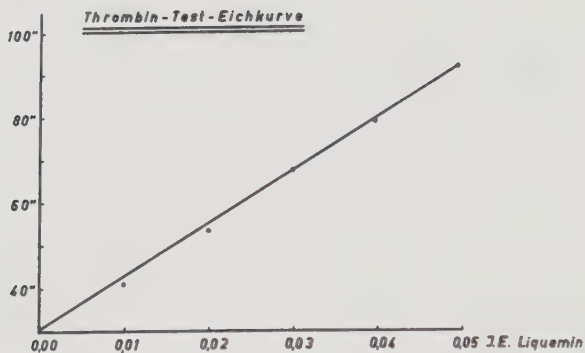
=====

Modellversuch: Thrombin - Test - Eichkurve.

Testplasma	Thrombin- verdünnung	Liquemin-aqua- dest.-Gemisch	Gerinnungszeiten in sec.	
ml	ml	ml I.E.		Mittelwert
0,1	0,1	0,1 = ----	23,4 23,4 31,8 31,8 32,1 28,2 30,1 30,0	30,1
0,1	0,1	0,1 = 0,01	41,6 39,2 40,8 41,8	40,7
0,1	0,1	0,1 = 0,02	55,6 53,8 53,1 51,8	53,6
0,1	0,1	0,1 = 0,03	66,7 68,5 67,6	67,6
0,1	0,1	0,1 = 0,04	73,5 80,5 78,0	79,0
0,1	0,1	0,1 = 0,05	83,1 91,3	92,3

Abb. Nr. 2

=====



Ergebnis:

Die Kurve zeigt mit steigenden Liquemin-Mengen einen geradlinigen Verlauf.

Es ist mit dem Thrombin-Test möglich, Heparinkonzentrationen bis zu 0,01 I.E. Heparin pro ml exakt nachzuweisen.

Eine solche Kurve dient uns im folgenden als Eichkurve, an der man die Heparinwerte in I.E. von Extrakten unbekannter Heparinkonzentration direkt ablesen kann.

Für die Auswertung eines solchen Extraktes ist allerdings jedesmal die Aufstellung einer neuen Eichkurve mit dem für den Versuch verwendeten Testplasma erforderlich.

IV. Eigene Methode zum Nachweis des im normalen Plasma
=====
des Menschen vorhandenen Heparins.
=====

Problematik:

MONKHOUSE³¹ arbeitete bei seinen Versuchen mit einem Ansatz von 5 - 10 ml Plasma. Dabei gelang es ihm nicht, Heparin beim Menschen nachzuweisen. Obwohl wir die Methode der "Phenolextraktion" zur Trennung von Proteinen und Polysacchariden aus Plasma in verschiedenen Punkten modifiziert haben, gelang es uns ebenfalls nicht, aus 10 ml Plasma einen Extrakt zu gewinnen, der im Thrombin-Test eine Verzögerung der Gerinnungszeit ergab (siehe Tabelle Nr. 3, Versuch Nr. 23 und 24). Insofern können wir die Ergebnisse von MONKHOUSE³¹ durchaus bestätigen.

Da wir, wie bereits eingangs betont, vermuteten, daß der menschliche Heparinblutspiegel sehr gering ist, erschien es uns ratsam, mit größeren Mengen von Plasma zu arbeiten. Wir verwendeten im Ansatz zunächst 50 ml Plasma. Es gelang uns, hieraus einen Extrakt anzureichern, der im Thrombin-Test eine deutliche Verzögerung der Gerinnungszeit verursachte. Die Ergebnisse unserer Versuchsanordnung waren gut reproduzierbar. Da aber eine Blutentnahme von 100 ml ($\approx$ 50 ml Plasma) für den Patienten eine Belastung darstellt, haben wir die Plasmamenge wieder reduziert. Aus einer Mindestmenge von 25 ml Plasma ($\approx$ 50 ml Blut) erlaubt unsere Methode, meßbare Mengen heparinaktiver Substanz zu erhalten.

In einigen wichtigen Punkten, die wir herausstellen wollen, unterscheidet sich unser Vorgehen von der MONKHOUSE'schen Methode³¹:

1. Während MONKHOUSE³¹ mit 5 - 10 ml Plasma arbeitet, verwenden wir mindestens 25 ml Plasma im Ansatz.
2. MONKHOUSE³¹ extrahiert das in der wässrigen Phase verbliebene Phenol mit Hilfe von Äther. Wir gaben der Dialyse gegen Wasser den Vorzug, da wir hiermit nicht nur Phenol, sondern auch die im Gerinnungstest störenden Serummineralien entfernten. So war es uns möglich, unsere Extrakte stark zu konzentrieren.
3. Während MONKHOUSE³¹ hauptsächlich das Bindungsvermögen für Toluidinblau für die Auswertung seiner Extrakte heranzieht, testen wir unsere Extrakte im Thrombin-Test und ermitteln den Heparin Gehalt anhand der Verlängerung der Gerinnungszeit.

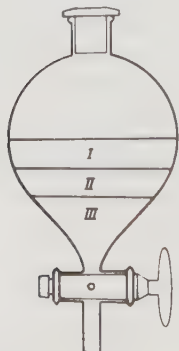
Methode:

a.) Extraktion von Heparin aus Plasma.

25 ml Plasma (oder Serum) werden mit 25 ml Phenol versetzt und in einem Schütteltrichter von ca. 250 ccm Inhalt kräftig geschüttelt.

Der Schütteltrichter wird mit seinem Inhalt über Nacht stehen gelassen.

Es haben sich dann drei Phasen abgesetzt, die folgendes Bild zeigen:



- | | |
|-------|--|
| Phase | I: wässrige Phase; enthält Polysaccharide und Wasser (phenol gesättigt). |
| Phase | II: enthält gefälltes Eiweiß und Phenol. |
| Phase | III: enthält Phenol (wassergesättigt). |

Phase II und III werden abgelassen,
Phase I wird erneut mit 25 ml Phenol versetzt,
kräftig schütteln,
über Nacht stehen lassen.

Phase II und III werden abgelassen,
Phase I wird nochmals mit 25 ml Phenol versetzt,
kräftig schütteln,
über Nacht stehen lassen.

Phase II und III werden abgelassen.
Phase I (= polysaccharidhaltige, wässrige Phase) ist
nunmehr klar und frei von Eiweiß.
Auf diese Weise gelingt es, Proteine und Polysaccharide zu
trennen, ohne daß die Polysaccharide dabei biologisch ver-
ändert werden.

Phase I wird nun in Dialysierschläuche gefüllt und über
Nacht gegen fließendes Wasser dialysiert, um das in Lösung
befindliche Phenol und Salze zu entfernen.

Das Dialysat wird im Wasserbad bis zur Trockene eingedampft
oder unter dem Ventilator getrocknet.

Dann werden die eingeengten Dialysate in 1,5 ml aqua dest.
gelöst und gefiltert.
Es folgt die:

b.) Gerinnungsphysiologische Auswertung im Thrombin-Test.

Schema Nr. 3.:

=====

Testplasma ml	Thrombin ml	gelöstes Dialysat ml	Zeit in sec.
0,1	0,1	0,1	

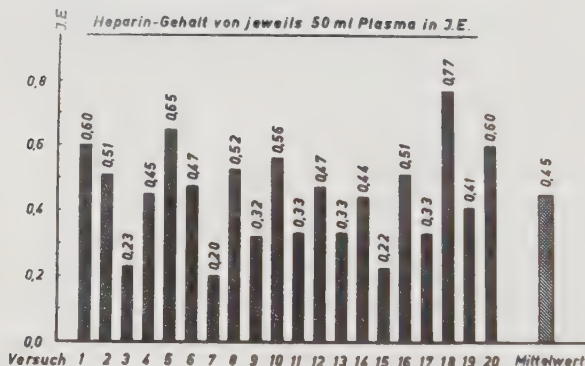
Dazu wird, wie in Kapitel III angegeben, eine Eichkurve aufgestellt, an der dann der Heparin Gehalt von 0,1 ml gelöstem Dialysat direkt abgelesen werden kann.

Mit dieser Methode wurden 24 Versuche durchgeführt:
siehe Tabelle Nr. 3 und Abb. Nr. 3.

Tabelle Nr. 3.

Versuch Nr.	Art des Plasma	Plasma- menge im Ansatz ml	Heparin-Gehalt von 50 ml Plasma in I. E.
1	frisches Mischplasma	50	0,60
2	frisches Mischplasma	50	0,51
3	frisches Pat.-Plasma	25	0,23
4	frisches Pat.-Plasma	25	0,45
5	frisches Pat.-Plasma	25	0,65
6	frisches Pat.-Plasma	50	0,47
7	frisches Pat.-Plasma	25	0,20
8	frisches Pat.-Plasma	25	0,52
9	frisches Pat.-Plasma	25	0,32
10	frisches Pat.-Plasma	50	0,56
11	frisches Pat.-Plasma	25	0,33
12	frisches Pat.-Plasma	25	0,47
13	frisches Pat.-Plasma	25	0,55
14	frisches Pat.-Plasma	25	0,44
15	frisches Pat.-Plasma	25	0,20
16	frisches Pat.-Plasma	50	0,51
17	frisches Pat.-Plasma	25	0,55
18	frisches Mischplasma	50	0,77
19	frisches Pat.-Plasma	25	0,41
20	frisches Pat.-Plasma	50	0,60
21	gealtertes, eingefro- renes Konservenplasma	50	0,15
22	gealtertes, eingefro- renes Konservenplasma	25	0,09
23	frisches Mischplasma	10	nicht meßbar
24	frisches Mischplasma	10	nicht meßbar

Abb. Nr. 3



Ergebnisse und Diskussion:

Es ist uns bei jedem der Versuche 1 - 20 möglich gewesen, einen Extrakt herzustellen, der im Thrombin-Test eine deutliche Verzögerung der Gerinnungszeit bewirkte.

Diese Verzögerung der Gerinnungszeit ist offensichtlich durch eine Neutralisation des Thrombins erfolgt. Es ist nicht bekannt, daß andere Polysaccharide als das Heparin Thrombin zu inaktivieren vermögen, und so glauben wir, daß es uns gelungen ist, mit unserer Methode natürliches im Blut vorhandenes Heparin nachgewiesen zu haben.

Ein Blick auf die Tabelle Nr. 3 bzw. auf die Abb. Nr. 3 zeigt, daß die Heparinwerte nicht konstant sind.

Der Heparin Gehalt schwankt vielmehr bei den einzelnen Versuchen zwischen den Grenzwerten 0,2 und 0,77 I.E. pro 50 ml Plasma. Wir schließen daraus, daß der Heparinblutspiegel beim Menschen keine konstante Größe ist und schon im Normalfall Schwankungen unterworfen ist.

Nach unseren Versuchen beträgt der normale mittlere menschliche Heparinblutspiegel 0,45 I.E. pro 100 ml Blut ($\approx$ 50 ml Plasma) mit einer Standardabweichung* von $\pm$ 0,15 I.E.

Wenn man in Betracht zieht, daß man, um therapeutisch in vivo einen gerinnungsverzögernden Effekt zu erzielen, 0,1 - 0,2 mg Heparin pro 100 ml Blut injizieren muß, und daß der von uns ermittelte Normalwert des Heparinblutspiegels wesentlich darunter liegt, so erscheint es uns als sehr fraglich, ob dem Heparin beim Menschen unter normalen Bedingungen überhaupt eine Rolle im System der Blutgerinnung zukommt. Wir befinden uns in dieser Hinsicht in Übereinstimmung mit der Ansicht von JUERGENS¹², LEIKINA⁵⁸ u.a. Nach LEIKINA⁵⁸ spielt Heparin nur unter bestimmten pathologischen Bedingungen eine Rolle.

Anm. zu Tabelle Nr. 3, Versuch 21 und 22:

Wie Versuch Nr. 21 und 22 zeigen, ist es erforderlich, mit frischem oder nur wenige Tage altem Plasma zu arbeiten, denn gealtertes eingefrorenes und wiederaufgetautes Plasma hatte einen großen Teil seiner Heparin-Aktivität verloren.

* Standardabweichung = $s = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum (x - \bar{x})^2}$

V. Metachromasie: Der " Tüpfel - Test " .

=====

Um zusätzlich nachzuweisen, daß es sich bei unseren Extrakten tatsächlich um Heparin handelt, haben wir uns eines von uns ausgearbeiteten " Tüpfel - Testes " bedient, der im Prinzip auf dem metachromatischen Effekt des Heparins beruht:

Versuchsbeschreibung:

Es wurde zu diesem Zweck eine größere Menge von Mischplasma durch Phenolextraktion und Dialyse aufgearbeitet. Das eingedampfte Dialysat wurde in einer geringen Menge von Aqua dest. gelöst, Proben dieses Extrakts auf Filterpapier aufgetropft und in einer Lösung von mit Toluidinblau gesättigtem Methanol mit 1 Tropfen Eisessig ca. 3 min lang gefärbt. Zum Differenzieren und Entfärben wurde das Filterpapier anschließend 3 min lang in Methanol gelegt.

Anhand von Liquemin-Vergleichslösungen:

1	:	10	(in 1 ml	500	I.E.)
1	:	100	(in 1 ml	50	I.E.)
1	:	1000	(in 1 ml	5	I.E.)
1	:	10000	(in 1 ml	0,5	I.E.)

kann man in
etwa den Gehalt des Extraktes an metachromatischer Substanz schätzen.

Liquemin-Verdünnungen:

1:10

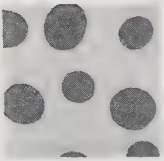


Abb.Nr.4

1:100



Abb.Nr.5

1:1000



Abb.Nr.6

1:10 000



Abb.Nr.7

Dialysat

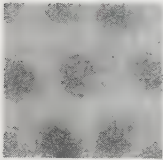


Abb.Nr.8

Ergebnis:

Der Extrakt zeigt eine wenn auch nicht sehr starke Metachromasie und sein Gehalt an Heparin dürfte schätzungsweise zwischen der der Liquemin-Vergleichslösung 1 : 10 und 1 : 100 liegen.

VI. Versuche über die Ausbeute (sog. "recovery-Versuche").

Um zu prüfen, welchen Prozentsatz von tatsächlich vorhandenem Heparin mit unserer Methode erfaßt werden kann, haben wir sowohl in vitro - als auch in vivo - Versuche mit definierten Heparinzusätzen durchgeführt und die Ausbeute nach Extraktion bestimmt.

"Recovery - Versuch" in vitro mit Zusatz von Liqueminmengen bekannter Konzentration zu Plasma.

Folgende Ansätze:

I 23 ml Plasma
2 ml Liquemin-Lösg. = 10 I.E.

25 ml heparinisiertes Plasma

II 23 ml Plasma
2 ml Liquemin-Lösg. = 5 I.E.

25 ml heparinisiertes Plasma

Die Ansätze I und II mit heparinisiertem Plasma weroen, wie angegeben, mit Phenol extrahiert, dialysiert, eingengt und das gelöste Dialysat im Thrombin-Test ausgewertet:

Tabelle Nr. 4.

=====

	Heparinisiertes Plasma im Ansatz in ml	Heparin Gehalt der 25 ml Gemische nach Phenolex- traktion bei Testung im Thrombin-Test in I. E.	Ausbeute in %
I	25 ml = 10 I.E.	3,5 I.E.	35
II	25 ml = 5 I.E.	1,625 I.E.	32,5

"Recovery - Versuch" in vitro mit Liquemin-Lösungen
bekannter Konzentration.

Es werden folgende Liquemin-aqua dest.-Lösungen angesetzt:

- I 25 ml Liquemin-Lösg. = 50 I.E.
- II 25 ml Liquemin-Lösg. = 25 I.E.
- III 25 ml Liquemin-Lösg. = 12,5 I.E.

Die Lösungen I, II, III werden, genau wie in den anderen Versuchen, mittels unserer Methode der Phenolextraktion verarbeitet. Das gelöste Dialysat wird im Thrombin - Test auf seinen Heparin Gehalt untersucht:

Tabelle Nr.5.

=====

	Lösungen im Ansatz	Heparin Gehalt der Lösng. von 25 ml nach Phenolextrak- tion bei Testung im Thrombin-Test in I. E.	Ausbeute in %
I	25 ml Lique.-Lösg. = 50 I.E.	30,0	60 %
II	25 ml Lique.-Lösg. = 25 I.E.	14,5	58 %
III	25 ml Lique.-Lösg. = 12,5 I.E.	5,5	42,5 %

" Recovery - Versuch " in vivo:

Es wurde zunächst einer Versuchsperson Citratblut entnommen. Das Plasma diente uns im Thrombin-Test als Bezugsplasma. Anschließend wurden dem Patienten 50 000 I.E. Liquemin i.v. injiziert.

Nach 5 min erfolgte die 2. Blutentnahme.

Eine Direktbestimmung einer kleinen Probe des heparinisierten Pat.-Plasmas (I) ergab im Thrombin-Test einen Gehalt an Liquemin von

337,5 I.E. in 25 ml Plasma.

25 ml heparinisiertes Pat.-Plasma wurden sodann mit der von uns entwickelten Methode der "Phenolextraktion" aufgearbeitet und im Thrombin-Test ausgewertet (II). Wir konnten einen Gehalt an Liquemin von

340,0 I.E. in 25 ml Plasma

nachweisen.

Tabelle Nr. 6.

=====

Thrombin-Test-Auswertung des in vivo "Recovery-Versuches".

	Bezugs- Plasma	Thrombin	heparini- siertes Pat.Plasma	In Aqua dest. gelöstes u. verdünntes Dialysat aus d.heparini- sierten Pat. Plasma nach Phenolextrak- tion	Liquemin- gehalt v. 25 ml Plas- ma in I. E.	Ausbeute in %
	ml	ml	ml	ml		
I	0,1	0,1	0,1	----	337,5	87,1
II	0,1	0,1	---	0,1	340,0	

Ergebnisse und Diskussion der "Recovery-Versuche":

Die angewandte Methode der Phenolextraktion von menschlichem Blutplasma mit anschließender Testung der gewonnenen Extrakte im Thrombin - Test ist - das sei hier noch einmal festgehalten - in der Lage, Heparin nachzuweisen.

Es muß aber aufgrund der Ergebnisse der "Recovery-Versuche" damit gerechnet werden, daß sich nur ein Teil des wirklich vorhandenen Heparins damit erfassen läßt.

Es ergibt sich weiterhin, daß die Ausbeute um so größer ist, je größer der ursprünglich vorhandene Heparinspiegel war.

Wieviel Prozent des tatsächlich im menschlichen Blut vorhandenen Heparins mit unserer Methode erfaßt werden, läßt sich aus den vorliegenden Befunden nicht sicher ermitteln. Es kann nur so viel gesagt werden, daß unsere Methode mehr leistet, als die bisher bekannten, denn ein Extrakt aus menschlichem Blutplasma, das eine eindeutige antikoagulierende Wirkung im Thrombin - Test besitzt, konnte mit den bisher bekannten Methoden noch nicht mit Sicherheit hergestellt werden.

VII. Pyrexal - Versuche.

Problemstellung:

Anknüpfend an das Kapitel Heparin und Schock im allgemeinen Teil unserer Ausführungen konnten wir, nachdem es gelungen war, eine Methode zu erarbeiten, mit der der natürliche Heparinblutspiegel des Menschen bestimmt werden kann, zu der Fragestellung übergehen, ob der im Tierexperiment nachgewiesene Anstieg des Heparinblutspiegels beim Pepton- und anaphylaktischen Schock auch für den Menschen Gültigkeit hat. Wie bereits erörtert, ist es allerdings nicht möglich, beim Menschen experimentell einen anaphylaktischen Schock auszulösen. Statt dessen haben wir Versuchspersonen *Pyrexal*, ein bakterielles Lipopolysaccharid aus *Salmonella abortus equi*, in verschiedener Dosierung injiziert, um dadurch eine vegetative Gesamtumschaltung mit Fieberanstieg zu erzielen, die in ihren Auswirkungen Ähnlichkeit mit dem Pepton- und anaphylaktischen Schock hat.

Wir untersuchten nun, ob in der Vorphase des Fieberanstieges oder während des Fiebers selbst eine Heparinämie auftritt.

Versuchsbeschreibung:

Die Versuche wurden in der Weise durchgeführt, daß Patienten, die *Pyrexal* aus therapeutischer Indikation erhielten, zunächst 50 ml Blut entnommen wurde, um den Ausgangswert des Plasmas an Heparin zu bestimmen. Dann erfolgte die Injektion von *Pyrexal*. Die 2. Blutabnahme von 50 ml erfolgte bei den einzelnen Versuchen zu verschiedenen Zeiten. Die Dosierung des *Pyrexals* und die Blutabnahmezeiten bei den einzelnen Versuchen sind in der Tabelle Nr. 7 aufgeführt.

Das Plasma wurde wie beschrieben aufgearbeitet und der dialysierte, konzentrierte Extrakt im Thrombin-Test auf seine antikoagulierende Wirkung analysiert.

Siehe Tabelle Nr. 7 und Abb. Nr. 9

Tabelle Nr. 7.

=====

Pyrexal - Versuche

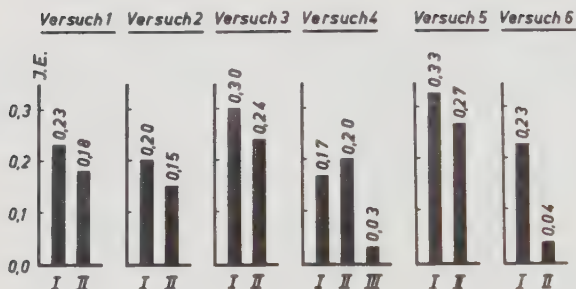
Pyrexal- versuch Nr.		Wievielte Pyrexal- injektion des Pat.	Verabfolgte Menge an Pyrexal in γ	Zeit der Blut- abnahme im Be- zug auf die Pyrexalinjek- tion	Erreichte Temp.z.Z. der Blut- entnahme	Heparin-Gehalt von 50 ml Plasma in I. E.
1	I II	5.	0,5γ	prae inject. 4 ^h post inj.	36,9°C. 37,4°C.	0,23 I.E. 0,18 I.E.
2	I II	6.	0,6γ	prae inject. 4 ^h post inj.	37,2°C. 37,7°C.	0,20 I.E. 0,15 I.E.
3	I II	6.	0,6γ	prae inject. 4 ^h post inj.	37,1°C. 37,7°C.	0,30 I.E. 0,24 I.E.
4	I II III	1.	0,1γ	prae inject. 30' post inj. 60' post inj.	36,5°C. 36,5°C. 36,7°C.	0,17 I.E. 0,20 I.E. 0,03 I.E.
5	I II	5.	0,1γ	prae inject. 30' post inj.	36,9°C. 36,9°C.	0,33 I.E. 0,27 I.E.
6	I II	2.	0,2γ	prae inject. 30' post inj.	36,2°C. 36,2°C.	0,23 I.E. 0,04 I.E.

Abb. Nr. 9

=====

Pyrexal-Versuche

(Heparin-Gehalt von jeweils 50 ml Plasma)



Ergebnisse und Diskussion:

Die Ergebnisse der Versuche zeigen, daß durch Pyrexal beim Menschen in den gewählten Dosierungen nach unserer Methode und zu den angegebenen Blutabnahmezeiten *kein* Anstieg des Heparinblutspiegels in Erscheinung tritt. (Der 30 min-Wert bei Pyrexalversuch Nr. 4 liegt innerhalb der Fehlerbreite der Methode.) Vielmehr ist sogar ein allerdings geringfügiger, aber bei allen Versuchen konstant auftretender Abfall desselben zu erkennen. Bei Pyrexal-Versuch Nr. 4 (60 min-Wert) und Nr. 6 ist er sogar sehr ausgesprochen.

Dies steht im Einklang mit den Versuchen von HOERDER und Mitarb.⁵⁹, F.K. BELLER⁶⁰, u.a.; die gezeigt haben, daß es nach Injektion von LPS (Pyrexal) zu einer Verkürzung der Gerinnungszeit und zu einer Aktivierung der Fibrinolyse kommt.

Es wäre denkbar, daß diese Verkürzung der Gerinnungszeit durch einen Abfall des Heparinblutspiegels bedingt ist.

Allerdings kann diese Verkürzung auch durch andere Faktoren bedingt sein, denn es ist bekannt, daß bei der vegetativen Gesamtumschaltung eine große Anzahl von Verschiebungen stattfindet.

VIII. Die Mastzellenleukämie.

=====

Durch freundliche Vermittlung von Herrn Prof. LENNERT (Senckenbergische Pathologie, Frankfurt) erhielten wir aus der Med. Abteilung des Marienstift-Krankenhauses in Braunschweig (Chefarzt: Dr. Brinkmann) Blut und Urin eines 51 jährigen Patienten, der an einer klinisch diagnostizierten und histologisch aus dem Knochenmark gesicherten Mastzellenreticulose litt, die später kurz ante finem in eine Mastzellenleukämie mit entsprechenden Veränderungen des peripheren Blutbildes überging (20-25000 Mastzellen pro cmm Blut; im Knochenmark 85 - 90% Mastzellen). Bei dem Pat. war die Blutgerinnung erheblich verzögert. Der seltene Fall wurde zwischenzeitlich von BRINKMANN⁶³ publiziert (Schw.med.Wschr. 89, 1046-1048, 1959).

Das Blut und der Urin dieses Patienten sollten geeignet sein, unsere Methode kritisch zu überprüfen. Tatsächlich gelang uns der Nachweis vermehrten Heparins sowohl im Blut wie auch im Harn.

Versuchsbeschreibung:

Das Plasma des Patienten wurde mit der angegebenen Methode drei mal mit Phenol extrahiert, dann dialysiert, eingedunstet und, wie beschrieben, auf den Gehalt an Heparin untersucht.

Zur Bestimmung des Heparin Gehaltes aus dem Urin gingen wir so vor, daß zunächst 45 ml Urin des Patienten auf 5 ml konzentriert wurden. Dieses Konzentrat wurde mehrere Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert, anschließend filtriert und dann im Thrombin-Test auf den Gehalt an antikoagulierenden Substanzen getestet.

Tabelle Nr. 8.

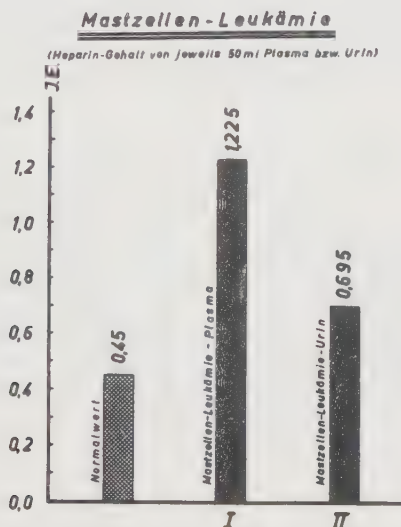
=====

		Heparin - Gehalt von 50 ml Plasma bzw. Urin in I. E.
Plasma des Mastzellenleukämie - Pat.	I	1,225 I.E.
Urin des Mastzellenleukämie - Pat.	II	0,695 I.E.

Siehe auch Abb. Nr. 10.

Abb. Nr. 10.

=====



Ergebnisse und Diskussion:

Wie aus den Versuchsergebnissen hervorgeht, haben wir bei dem Patienten einen Heparinblutspiegel von

1,225 I.E. in 50 ml Plasma

ermitteln können.

Das bedeutet einen Anstieg des Heparinblutspiegels um etwa das Dreifache der von uns bestimmten Norm von 0,45 I.E. in 50 ml Plasma.

Im Urin des Patienten stellten wir einen Heparin Gehalt von

0,695 I.E. in 50 ml Urin

fest.

In dem Ergebnis dieses Versuches sehen wir einen Beweis dafür, daß unsere Methode es erlaubt, natürliches im Menschenblut vorhandenes Heparin nachzuweisen.

1. Zusammenfassung:

=====

Im allgemeinen Teil dieser Arbeit wird zunächst berichtet über die Chemie des Heparins, seine Bildungsstätten und seine Ausscheidung.

Weiterhin wird erörtert, daß das Heparin zur Entfaltung seiner Wirkungen eines Co-Faktors im Blutplasma von Eiweißcharakter bedarf.

Das Problem des Nachweises von freiem und gebundenem Heparin wird kritisch beleuchtet.

Sodann wird von der gerinnungsnemmenden Wirkung des Heparins mit seinen Angriffspunkten in den verschiedenen Phasen der Blutgerinnung berichtet. Heparin ist demnach ein polyvalentes Antikoagulum.

Ein besonderes Kapitel ist der Bedeutung des Heparins im repton- und anaphylaktischen Schock gewidmet. Dabei wird darauf hingewiesen, daß alle angeführten Ergebnisse nur im Tierexperiment beobachtet worden sind. Ob diese Ergebnisse auf den Menschen übertragen werden können, ist bisher nicht erwiesen.

Des weiteren werden einige neue von therapeutischen Wirkungen des Heparins angegeben.

In einem Schema (Schema Nr. 2) sind die bisher in der Literatur angegebenen Werte des normalen menschlichen Heparinblutspiegels aufgeführt. Bei einer kritischen Betrachtung dieses Schemas kommt man, wie auch andere Autoren, zu dem Ergebnis, daß die Höhe des menschlichen Heparinblutspiegels bis heute noch nicht mit Sicherheit ermittelt werden konnte.

Im experimentellen Teil dieser Arbeit gingen wir von der Vermutung aus, daß der menschliche Heparinblutspiegel so gering ist, daß die bisher praktizierten Methoden 1. nicht empfindlich genug sind, um diesen nachzuweisen, und 2. daß der von den verschiedenen Autoren geführte Nachweis von Heparin mittels Metachromasie bzw. Recalcifizierungszeit, nicht allein für Heparin spezifisch ist.

Wir haben zunächst nach der von MONKHOUSE³¹ entwickelten Methode gearbeitet und festgestellt, daß sich damit Heparinwerte von weniger als 15 I.E. Heparin nicht sicher nachweisen lassen.

Die von MONKHOUSE³¹ angegebene Methode der Phenolextraktion von Blutplasma wurde in wesentlichen Punkten abgewandelt. Wir konnten auf diese Weise eine Methode entwickeln, mit der es gelingt, den Heparinspiegel des menschlichen Blutplasmas zu ermitteln.

Das Prinzip unserer Methode besteht darin, 25 ml menschliches Blutplasma drei mal mit je 25 ml Phenol zu extrahieren und damit die Serumpolysaccharide schonend vom Eiweiß zu befreien. Die polysaccharidhaltige Phase - sie enthält das Heparin, da dieses ja chemisch gesehen ein Polysaccharid ist - wird anschließend gegen Wasser dialysiert, um das in Lösung verbliebene Phenol und die Serummineralien zu entfernen. Das Dialysat wird im Wasserbad zur Trockene eingeengt oder - noch schonender - unter dem Ventilator getrocknet. Das eingeengte Dialysat wird in 1,5 ml aqua dest. gelöst und gefiltert.

Es folgt die gerinnungsphysiologische Auswertung der erhaltenen Extrakte im Thrombin - Test, da dieser wohl als am spezifischsten für den Nachweis von Heparin angesehen werden kann.

Mit dieser Methode fanden wir einen mittleren menschlichen Heparinblutspiegel von

0,45 I.E. pro 50 ml Plasma mit einer
Standardabweichung von $\pm 0,15$ I.E.

In Versuchen über die Ausbeute, bei denen wir Heparin (Liquemin La-Roche) in bekannten Konzentrationen teils in vitro, teils in vivo Plasma zusetzen, ermittelten wir das wieder gefundene Heparin. Wir stellten dabei fest, daß zwar ein Teil des ursprünglich vorhandenen Heparins verloren geht, daß die Phenolextraktion aber dennoch zu brauchbaren Ergebnissen führt.

In einer Versuchsreihe mit "Fieberpatienten" wurde versucht, einen Anhalt dafür zu gewinnen, ob durch die Auslösung künstlichen Fiebers eine Schwankung des Heparinspiegels erfolgt, wie sie im Tierversuch beim Pepton- und anaphylaktischen Schock bewiesen ist. Dabei zeigte sich, daß in der Vorphase bzw. auf der Höhe des Fiebers -30', 60' und 240'min nach Injektion des bakteriellen Pyrogens- ein Abfall des Heparinblutspiegels zu beobachten ist. Ob diese Senkung die Ursache für die von HOERDER und Mitarb.⁵⁹ sowie F.K.BELLER⁶⁰ festgestellte Verkürzung der Blutgerinnung nach Injektion von Pyrexal ist, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Schließlich konnten wir Blut- und Harnproben eines Patienten analysieren, der an der sehr seltenen Mastzellenleukämie erkrankt war und kurze Zeit darauf daran verstarb. Unsere Analysen ergaben, daß im Blut mindestens der dreifache Heparin Gehalt des normalen Plasmas bestand.

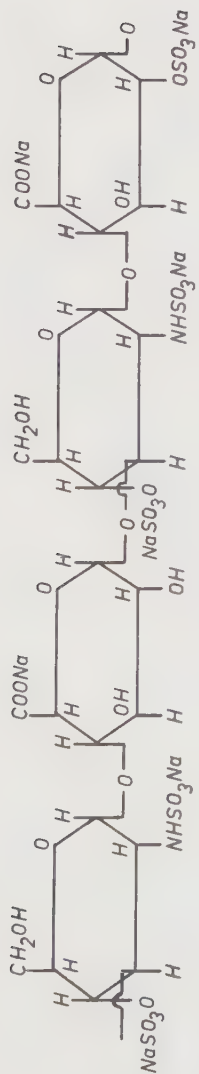
C. L i t e r a t u r - V e r z e i c h n i s .
=====

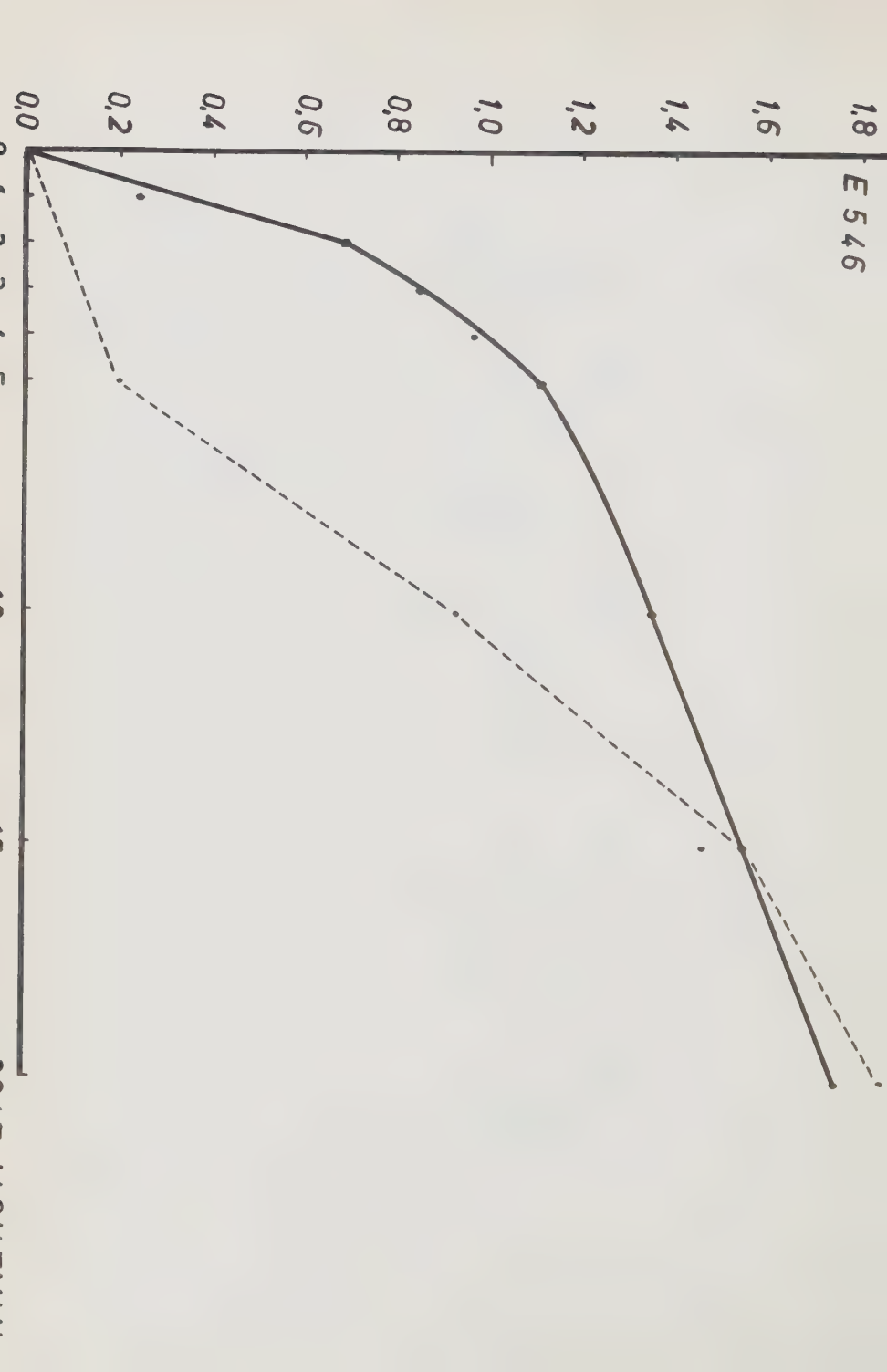
- 1.) HOWARTH, W.H.; HOLT, E.: Amer. J. Physiol. 47, 328 (1918)
- 2.) MAC LEAN, J.: Johns Hopkins Hosp. Bull. 31, 453, (1920)
- 3.) JORGES, E.: Acta Biochem. J. 29, 1817, (1935)
- 4.) WOLFROM, M.L.; MONTGOMERY, R.;
KARABINOS, J.V.; RATHGEB, P.: J.Amer. Chem. Soc. 72, 5796, (1950)
- 5.) EMTLICH, P.: Arch. Mikroskop. Anat. 13, 263, (1877)
- 6.) LISON, G.: Arch. Biol. (Fr.) 599, (1935)
Bull. Soc. Chem. Biol. (Fr.) 18, 225 (1936)
C.v.Soc. Biol. 1, 382, (1935)
- 7.) WILANDER, O.: Scand. Arch. f. Physiol. Suppl. 15, (1938-1939)
- 8.) JORGES, J.E.; HOLMGREN, H.;
WILANDER, O.: Z.Mikroskop. an. Forschg. 42, 279, (1937)
- 9.) ZOLLINGER, H.U.: Exper. 6, 384, (1950)
- 10.) LAVIS; BEHRENS u. TAUBERT: Klin.Wschr. 30, 76, (1952)
- 11.) MARTIN, H.; ROSE, G.: Acta haematol. Vol. 10, 26, (1953)
- 12.) JORGES, J.: Klin.Methoden der Blutgerinnungs-
analyse, Georg Thieme Verlag,
Stuttgart 1959, S. 18
- 13.) SCHURER, W.: Helv. med. Acta 13, 328, (1946)
- 14.) FRICK, R.: Acta haematol. 4, 97, (1950)
- 15.) MARLET, R.; WINTERSTEIN, A.: Helv. Physiol. Acta 9, 6 - 32, (1951)
- 16.) RAUTESCH, E.: Dtsch. Med. Wschr. 46, 1846 (1956)
- 17.) SIMON, K.H.: Materia Medica Norrmark XI/9, 269-279, Sept. 1959
- 18.) Le ROCHL - Literatur-Dienst: Nr. 8, Aug. 1960
- 19.) LOOMIS, E.C.: J. Labor. a Clin. Med. 34, 631, (1949)

- 20.) LYTTLETON, J.W.: Biochemic. J. 58, 15, (1954)
- 21.) GOOSENS, N.; GASTPAR, H.;
SEITZ, W.: Klin. Wschr. S. 646 - 651, (1954)
- 22.) DYKERHOFF, H.; MARX, E.: Biochem. Z. 316, 255, (1944)
- 23.) QUICK, A.: "The Physiology and Pathology of
Hemostasis", Henry Kimpton, London
1951, S. 159 - 163
- 24.) von KAULLA, K.; MC.DONALD, T.S.: Blood 13, 811 - 821,
(1958)
- 25.) MARBET, R.; WINTERSTEIN, A.: Experientia, Vol. X,
Fasc. 7, S. 273 - 281 (1954)
- 26.) QUICK, A.: Amer. J. Physiol. 123, 712, (1933)
- 27.) BURSTEIN, M.: Arch. Int. Pharm. et Therap. 101,
111, (1955)
- 28.) LOEB, J.: Arch. Sci. Physiol. 10, 129 - 142,
(1956)
- 29.) LYTTLETON, J.W.: Biochemic. J. 58, 15, (1954)
- 30.) HORN, Z.; BORSODI, L.: Schweiz. Med. Wschr. 73, Jahr-
gang, Nr. 43, (1948)
- 31.) MONROUSE, F.C.; JAQUES, L.B.: J. of Labor. & Clin.
Med. Vol. 36, Nr. 5 S. 732, Nov.
1950
- 32.) MARBET, R.; WINTERSTEIN, A.: Aerztl. Forschg. 9, 460,
(1955)
- 33.) LOSNER, S.; VOLK, B.W.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med.
87, 417, (1954)
- 34.) FONIO: Schweiz. Med. Wschr. 84, 372, (1954)
Medizinische 15, 522, (1955)
- 35.) MARX, R.; SCHMIDT, H.: Aerztl. Forschg. 5, 192, (1951)
- 36.) SCHMIDT-MÜLHEIM, A.: Du Bois Arch. 1880
- 37.) FUCHS, H.J.; FALKENHAUSEN, M.;
HARDTMAN, E.: Z. Exper. Med. 64, 227, (1929)
- 38.) FISCHER, H.: Habilitationsschrift. (1954)
- 39.) FISCHER, H.; KREUZER, L.;
ARGENTON, H.: Aus "Thrombose und Embolie".
1. internat. Tagung, Basel 1954,
S. 136 - 141

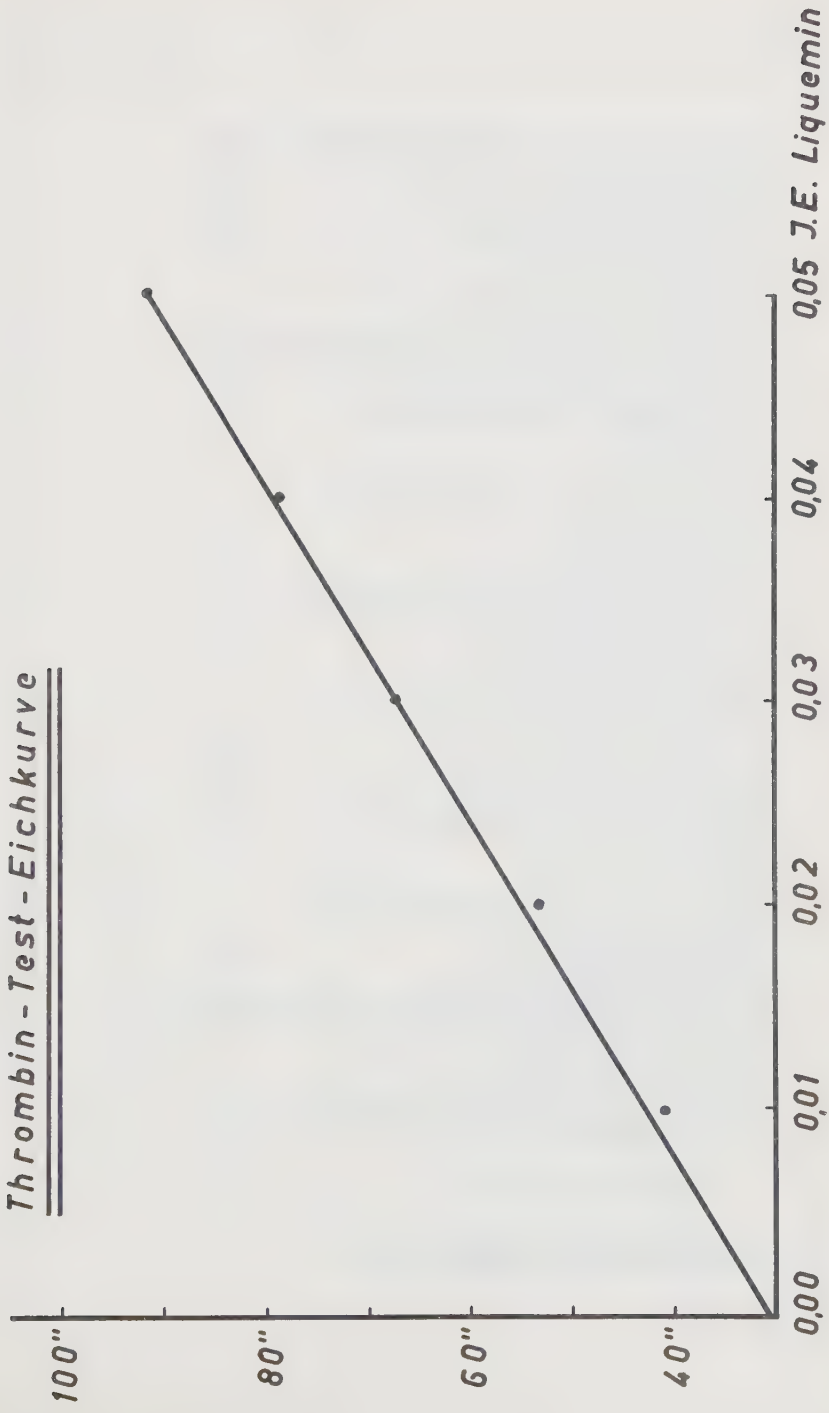
- 40.) v.FALKENHAUSEN, M.: Arch. f. exp. Path. u. Pharm.
1929, 145, 46, 100
Arch. f. exp. Path. u. Pharm.
1929, 142, 342
- 41.) FISCHER, H.; FRITZSCHE, W.;
ARGENTON, H.: Klin. Wschr. 36, 411 - 418, (1958)
- 42.) FRITZSCHE, W.: Transactions of the 6th Congress
European Society of Haematology,
Copenhagen 1957
- 43.) MATIS: "Thrombose und Embolie" B. Schwabe
u. Co. (Basel 1955)
- 44.) STORTI, u.Mitarb.: Experientia 10, 225, (1954)
- 45.) GROSSMAN, M.; MOELLER, H.;
PALM, L.: Proc.Soc.Exper. Biol. a. Med. 90,
106, (1955)
- 46.) LEVY, S.W.: Rev. canad. de Biol. 17, 1-61,
(1958)
- 47.) KELLER, R.: Medizinische 1954, 995 - 998
- 48.) ENGBERG, H.; KUHN, R.;
STEINMAN, M.: Circulation 13, 489 - 498, (1956)
- 49.) ASTRUP, P.: Heparinundersoegelser, Nordiske
Videnskabsoghaenkel, Copenhagen,
1944; und Acta Pharmatol. Toxicol.
3, 165, (1947)
- 50.) JAKUES, L.B.; MONKHOUSE, F.C.;
STEWART, M.: J. of Physiol. Vol. 109, Nos. 1 + 2,
S. 41, Aug. 1949
- 51.) GIBSON, R.B.; CARR, T.L.;
GREEN, S.; FOWLER, W.M.: Federation Proceedings Vol.
10, 49, (1951)
- 52.) GIBSON, R.B.; CARR, T.L.;
GREEN, S.; FOWLER, W.H.: Proc. Soc. Exper. Biol. u.
Med. Vol. 79, S.577 - 580, (1952)
- 53.) BASSIOUNI, M.: Journ. of Clin. Pathology Vol. 7,
Nr. 4, 330, nov. 1954
- 54.) FREEMAN, L.; ENGBERG, H.;
DUDLEY, A.: Americ. J. of Clin. Path. Vol.
24, 599 - 616, (1954)

- 55.) ENGELBERG, H.; DUDLEY, A.;
FREEMAN, L.: J. Lab. Clin. Med. 46, Nr. 4,
653, (1955)
- 56.) ROSIVAL, V.; SELECKY, F.V.: *Physiol. bohemoslov.* 8,
146 - 148, (1959)
- 57.) JAKUES, L.B.: *Rev. hémat.* 7, 74, (1952)
- 58.) LEIKINA, E.M.: *Bjull. eksper. Biol. i. Med.*
44, H, 9, 3 - 6, (1957)
- 59.) HOERDER, M.H.; KICKHOEFER, B.;
WENDT, F.: *Klin. Wschr.* 4, 164 - 166, (1958)
- 60.) BELLER, Fritz-Karl;
SCHUMACHER, G.: *Dtsch. Med. Wschr.* 48, 2029, (1957)
- 61.) ASTRUP, T.; DARLING, S.: *Acta Physiol. Scand.* 5, 13,
(1943)
- 62.) SEEGBERS, W.H.; KLEIN, P.D.: *Blood* 5, 742, (1950)
- 63.) BRINKMANN, E.: *Schweiz. med. Wschr.* 89, 1046 -
1048, (1959)

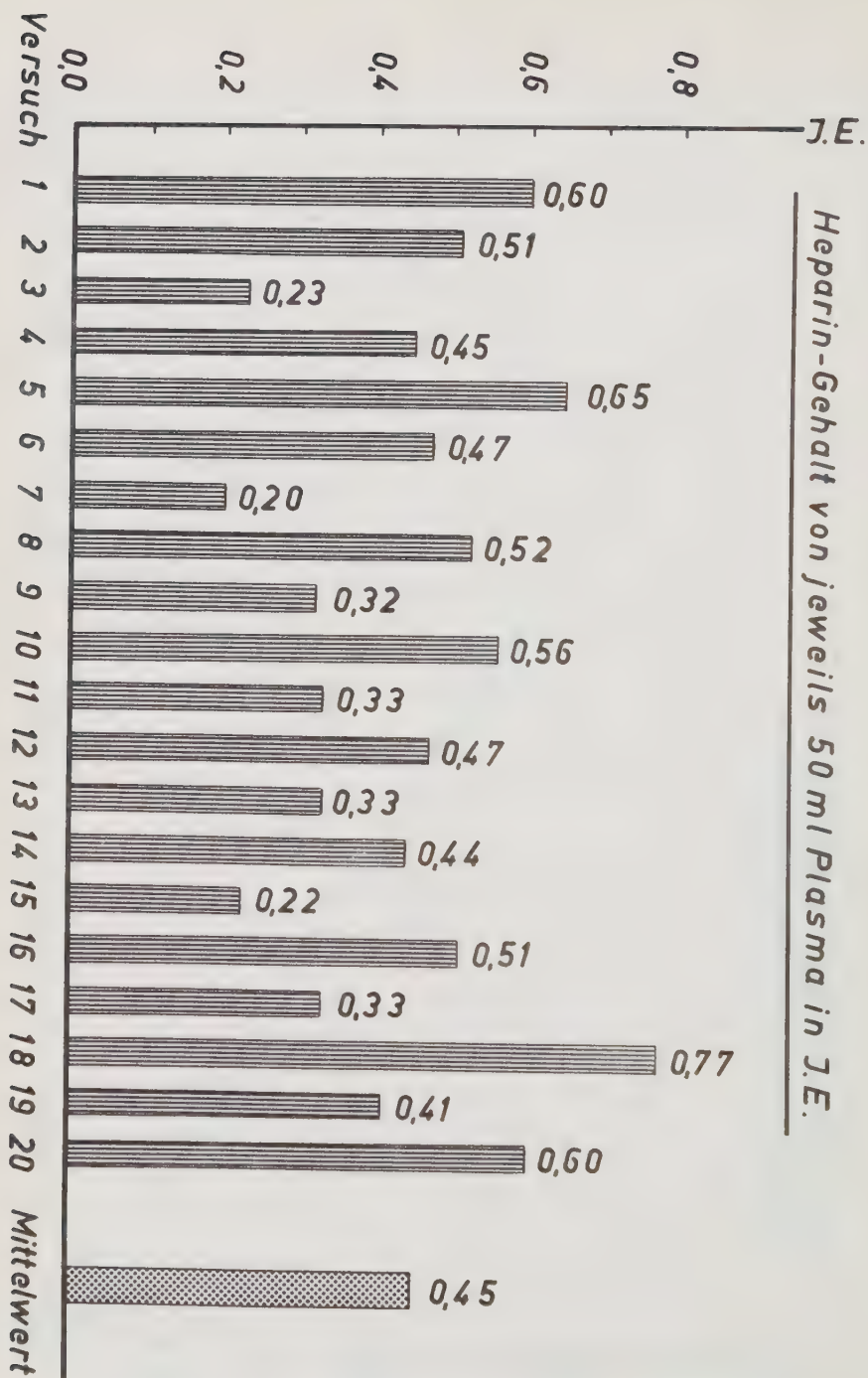




Thrombin - Test - Eichkurve

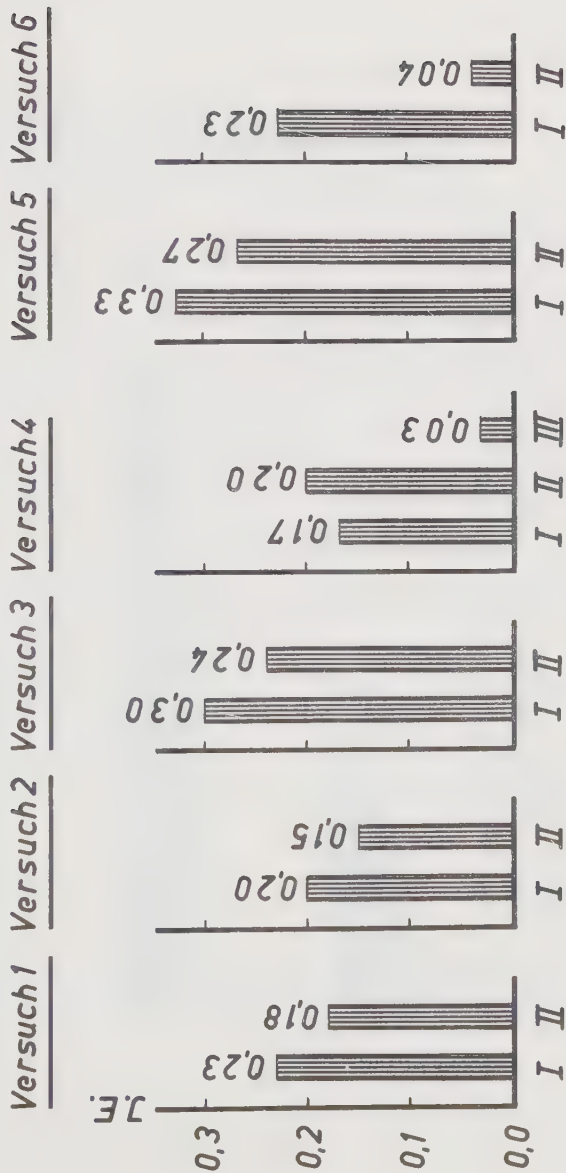


Heparin-Gehalt von jeweils 50 ml Plasma in J.E.



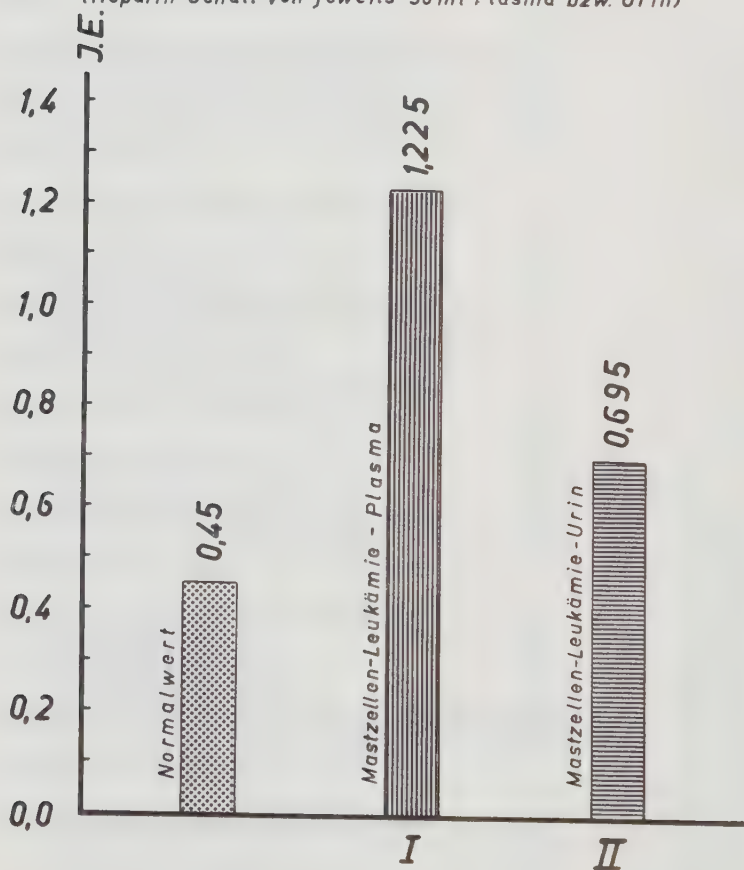
Pyrexal - Versuche

(Heparin - Gehalt von jeweils 50 ml Plasma)



Mastzellen - Leukämie

(Heparin-Gehalt von jeweils 50 ml Plasma bzw. Urin)



Lebenslauf:

Am 27.10.1931 wurde ich in Wiesbaden als Sohn des damaligen Regierungsrates und jetzigen Regierungsdirektors a.D. Dr. jur. Erich Kollath und seiner Frau Emmy Kollath, geb. Obergethmann, geboren. Mit sieben Jahren trat ich in die Volksschule ein. Nach vier weiteren Jahren wurde ich an einem Realgymnasium in Wiesbaden aufgenommen. Nach einer längeren Unterbrechung durch Kriegs- und Nachkriegseinwirkungen bestand ich Ostern 1955 das Abitur. Im Sommersemester 1955 habe ich mich an der Johann Wolfgang von Goethe-Universität in Frankfurt am Main als Student der Medizin immatrikulieren lassen. Nach Absolvierung von fünf Semestern medizinischen Studiums an der Universität Frankfurt am Main habe ich am 23.10.1957 die ärztliche Vorprüfung abgelegt. Nach weiteren sechs klinischen Semestern an der Frankfurter Universität habe ich mich zum medizinischen Staatsexamen gemeldet, das ich am 22. März 1961 bestanden habe. Zur Zeit bin ich Medizinal-Assistent an der Universitätsklinik in Frankfurt am Main.

